

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/09444

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61L27/26 A61L27/34 A61L27/38 //C08L89/06,C08L5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y          | WO 97 45532 A (UNIV BROWN RES FOUND)<br>4 December 1997 (1997-12-04)<br>page 1, line 13 -page 4, line 25<br>page 6, line 26 -page 7, line 11<br>page 9, line 7 - line 31<br>example 1    | 1-24                  |
| Y          | WO 98 31345 A (ORQUEST INC)<br>23 July 1998 (1998-07-23)<br>page 8, line 13 - line 19<br>page 16, line 16 - line 29<br>example 1   | 1-24                  |
| A          | WO 97 18842 A (FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS<br>SRL ;ABATANGELO GIOVANNI (IT); CALLEGAR)<br>29 May 1997 (1997-05-29)<br>page 3, line 19 -page 4, line 8<br>page 6, line 20 -page 7, line 17 | 1,5,6,<br>20-23       |
|            | ---<br>-/-   |                       |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2000

Date of mailing of the international search report

26/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diederer, J

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 99/09444

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                       | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | EP 0 648 480 A (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL)<br>19 April 1995 (1995-04-19)<br>column 2, line 46 -column 4, line 2<br>----- | 1,4,5,7,<br>8,23      |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Informa  patent family membersInter.  Application No

PCT/99/09444

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---|---------------------|---|--|
| WO 9745532                                | A | 04-12-1997          | EP 0907721 A<br>US 5939323 A  | 14-04-1999<br>17-08-1999   |
| WO 9831345                                | A | 23-07-1998          | US 5866165 A<br>AU 5920398 A<br>US 5972385 A  | 02-02-1999<br>07-08-1998<br>26-10-1999   |
| WO 9718842                                | A | 29-05-1997          | IT PD950225 A<br>AU 709236 B<br>AU 7693496 A<br>CA 2238011 A<br>EP 0863776 A<br>JP 2000500372 T             | 20-05-1997<br>26-08-1999<br>11-06-1997<br>29-05-1997<br>16-09-1998<br>18-01-2000               |
| EP 0648480                                | A | 19-04-1995          | GB 2281861 A<br>AU 692457 B<br>AU 7300794 A<br>CA 2132368 A<br>JP 7204261 A<br>US 5766631 A<br>ZA 9407063 A | 22-03-1995<br>11-06-1998<br>06-04-1995<br>22-03-1995<br>08-08-1995<br>16-06-1998<br>13-03-1996 |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## ENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

|  |  |
|--|--|
| <b>Date of mailing</b> (day/month/year)<br>14 August 2000 (14.08.00)             |  |
| <b>International application No.</b><br>PCT/EP99/09444                           | <b>Applicant's or agent's file reference</b>                         |
| <b>International filing date</b> (day/month/year)<br>03 December 1999 (03.12.99) | <b>Priority date</b> (day/month/year)<br>03 December 1998 (03.12.98) |
| <b>Applicant</b><br>ANGELE, Peter et al  |  |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

21 June 2000 (21.06.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|  |   |
|--|---|
| <b>The International Bureau of WIPO</b><br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer<br>Charlotte ENGER<br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 09 MAR 2001

WIPO

PCT

## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T 16


|  |  |   |
|--|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts<br>---   | <b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) |   |
| Internationales Aktenzeichen<br>PCT/EP99/09444   | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)<br>03/12/1999  | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)<br>03/12/1998 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK<br>A61L27/26 |  |   |
| Anmelder<br>NERLICH, Michael ....et al   |  |   |

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 3 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

### 3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

|  |  |
|--|--|
| Datum der Einreichung des Antrags<br><br>21/06/2000  | Datum der Fertigstellung dieses Berichts<br><br>06.03.2001                           |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:<br><br> Europäisches Patentamt<br>D-80298 München<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter<br><br>Markopoulos, E<br><br>Tel. Nr. +49 89 2399 8658 |



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-20 ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-24 ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1-4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09444

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.  
☒ Ansprüche Nr. 20-22 in Bezug auf industrielle Anwendbarkeit.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 20-22 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):  
**siehe Beiblatt**
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.  
☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/09444

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

|                                |                 |              |
|--------------------------------|-----------------|--------------|
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche   | 1-24         |
|                                | Nein: Ansprüche | -            |
| Erfinderische Tätigkeit (ET)   | Ja: Ansprüche   | 1-24         |
|                                | Nein: Ansprüche | -            |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche   | 1-19, 23, 24 |
|                                | Nein: Ansprüche | -            |

### 2. Unterlagen und Erklärungen **siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Die Ansprüche 20-22 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

2. Die Verwendung von humanen Embryonalzellen wie in der Beschreibung angezeigt (S. 12, Abs. 5 - S. 13, Abs. 1; Bsp. 2) könnte in manchen Vertragsstaaten als Verstoß gegen die öffentliche Ordnung angesehen werden.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 98 31345 A (ORQUEST INC) 23. Juli 1998 (1998-07-23)

D2: WO 97 45532 A (UNIV BROWN RES FOUND) 4. Dezember 1997 (1997-12-04)

2. D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart (vgl. S. 3, Z. 15 - S. 6, Z. 8) eine Kollagen-Polysaccharid-Matrix zur Reparatur von Gewebe wie beispielsweise Knochen, von der sich der Gegenstand des Anspruchs 1 dadurch unterscheidet, daß das Kollagen nicht hydrolysiert vorliegt. Als Polysaccharid kann Hyaluronsäure bzw. ein Derivat hiervon (S. 3, Z. 24; S. 6, Z. 10-21) verwendet werden, und das Gewichtsverhältnis Kollagen zum Polysaccharid beträgt 99:1 bis 1:99 (S. 7, Z. 22 - S. 8, Z. 19) und fällt somit in den Bereich von Anspruch 1.

D2 beansprucht eine Matrix, welche nur Hyaluronsäurederivate wie beispielsweise ihren Benzylester enthält, wobei die Herstellung und Verwendung dieser Matrix mit Ausnahme der Entfernung des ersten Lösungsmittels und anschließendem Lösen der pulverförmigen Verbindung (Anspruch 14 der Anmeldung), eine Tatsache, die nicht für die Matrix in D2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

zutrifft, denjenigen der vorliegenden Anmeldung entsprechen (S. 1, Z. 13 - S. 4, Z. 25). Aufgrund der obigen Ausführungen sind die Ansprüche 1-24 als neu zu erachten.

3. Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, eine Alternative zur Kollagen-Polysaccharid-Matrix aus D1 zur Reparatur von Gewebe zu finden.

Da einerseits weder aus D1 noch aus D2 die Verwendung von hydrolysiertem Kollagen offenbart ist und andererseits vom Anmelder ausgeführt wurde, daß sich die Verwendung von hydrolysiertem Kollagen in der Kompositmatrix vorteilig gegenüber der Kompositmatrix von D1 verhält -und zwar ist die Adhärenz von Zellen, die die Matrix besiedeln sollen, größer, und die Entzündungsneigung durch das beanspruchte Material im Kniegelenk geringer-, scheint die in Anspruch 1 vorliegende Kompositmatrix erfinderisch zu sein. Desweiteren zeigte die Matrix nach D1 Quellneigung mit Flüssigkeit und Kontraktionsverhalten beim Applizieren von Zellsuspensionen und ist somit nicht durch Größenstabilität wie die beanspruchte Matrix gekennzeichnet. Von Wichtigkeit ist dies u.a. zur Herstellung von Implantaten mit bestimmter räumlicher Abmessung.

Gegenüber der Matrix von D2 ist ebenfalls eine verbesserte Zelladhärenz als auch Zellproliferation nachgewiesen worden, nämlich aufgrund der vorliegenden Doppelporenstruktur, die mittels des in Anspruch 14 dargelegten Verfahrens erzielt werden kann.

Daher scheint der Gegenstand der unabhängigen Ansprüche 1, 14, 20, 23 und 24 auf erfinderischer Tätigkeit zu beruhen und damit das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium zu erfüllen.

Dasselbe gilt für alle abhängigen Ansprüche.

4. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 20-22 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

elr  
09/857343  
Translation  
5060



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|  |   |   |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference  | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |   |
| International application No.<br>PCT/EP99/09444  | International filing date (day/month/year)<br>03 December 1999 (03.12.99)   | Priority date (day/month/year)<br>03 December 1998 (03.12.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>A61L 27/26, 27/34, 27/38, C08L 89/06, 5/08 |   |   |
| Applicant<br>NERLICH, Michael  |   |   |

|  |
|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>  |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> |

|   |   |
|---|---|
| Date of submission of the demand<br>21 June 2000 (21.06.00) | Date of completion of this report<br>06 March 2001 (06.03.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                     | Authorized officer  |
| Facsimile No.   | Telephone No.   |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/09444

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-20 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-24 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-4 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/09444

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 20-22

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 20-22  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/09444

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

1. Claims 20 to 22 relate to a subject matter which, in this examiner's opinion, falls under PCT Rule 67.1(iv). A report regarding the industrial applicability of the subject matter of these claims therefore cannot be established (PCT Article 34(4)(a)(i)).

2. The use of human embryonic cells as indicated in the description (page 12, fifth paragraph to page 13, first paragraph; Example 2) could be regarded as contrary to public order in some contracting states.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/09444

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

|                               |        |              |     |
|-------------------------------|--------|--------------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-24         | YES |
|                               | Claims |              | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-24         | YES |
|                               | Claims |              | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-19, 23, 24 | YES |
|                               | Claims |              | NO  |

## 2. Citations and explanations

## 1. This report makes reference to the following documents:

D1: WO-A-98/31345 (ORQUEST INC) 23 July 1998 (1998-07-23)

D2: WO-A-97/45532 (UNIV BROWN RES FOUND) 4 December 1997 (1997-12-04).

2. D1, which is regarded as the closest prior art, discloses (see page 3, line 15 to page 6, line 8) a collagen polysaccharide matrix for repairing tissue such as bones, from which the subject matter of Claim 1 differs in that the collagen is not hydrolyzed. Hyaluronic acid or a derivative thereof (page 3, line 24; page 6, lines 10-21) can be used as polysaccharide, and the weight ratio of collagen to polysaccharide is 99:1 to 1:99 (page 7, line 22 to page 8, line 19) and is therefore covered by the range according to Claim 1.

D2 claims a matrix which contains only hyaluronic acid derivatives such as their benzyl esters, the production and use of this matrix corresponding to that of the present application (page 1, line 13 to page 4, line 25) except for the removing of the first solvent and subsequent dissolving of the powdered compound (Claim 14 of the application) -which does not apply to the matrix in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

D2. In light of the above statements, Claims 1 to 24 can be regarded as novel.

3. The problem to be solved by the present invention can therefore be regarded as that of finding an alternative to the collagen polysaccharide matrix in D1 for repairing tissue.

Since neither D1 nor D2 disclose the use of hydrolyzed collagen and since the applicant explained that the use of hydrolyzed collagen in the composite matrix is advantageous in relation to the composite matrix in D1 - namely the adherence of cells which are suppose to populate the matrix is increased and the proneness to inflammation by the claimed material in the knee joint is reduced -, the composite matrix according to the present Claim 1 appears to be inventive. Moreover, the matrix according to D1 has shown a proneness to swelling with liquid and contraction behavior when cell suspensions are applied and is therefore not characterized by as high stability as the claimed matrix. This is important inter alia for producing implants with a particular spatial dimension.

Improved cell adherence and cell proliferation in relation to the matrix in D2 was proven, namely owing to the present double pore structure which can be achieved by means of the method defined in Claim 14.

Thus the subject matter of independent Claims 1, 14, 20, 23 and 24 appears to involve an inventive step and the criterion stipulated by PCT Article 33(3) is therefore met.

The same applies to all the dependent claims.

4. The PCT Contracting States do not have uniform criteria

THIS PAGE BLANK (USP 10)



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 99/09444

for assessing the industrial applicability of the subject matter of the present Claims 20 to 22. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :

A61L 27/26, 27/34, 27/38 // C08L 89/06,  
5/08

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/32251

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

8. Juni 2000 (08.06.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09444

(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Dezember 1999 (03.12.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 55 890.2 3. Dezember 1998 (03.12.98) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): NER-  
LICH, Michael [DE/DE]; Fichtenstrasse 15, D-93080  
Pentling (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ANGELE, Peter [DE/DE];  
Auhölzlweg 10, D-93053 Regensburg (DE). KUJAT,  
Richard [DE/DE]; Am Weingert 1, D-93186 Pettendorf  
(DE).(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten-  
strasse 16, D-80538 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE,  
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,  
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,  
MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE,  
LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches  
Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
eintreffen.(54) Title: POROUS COMPOSITE MATRIX AND THE PRODUCTION AND USE THEREOF

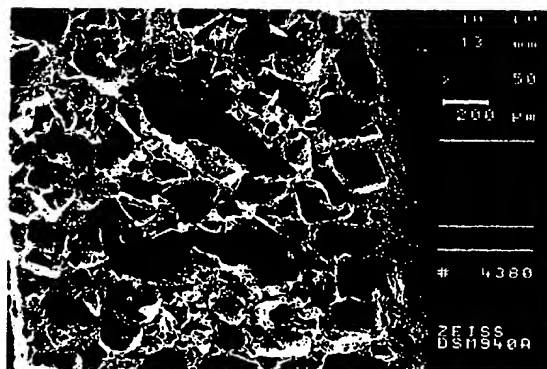
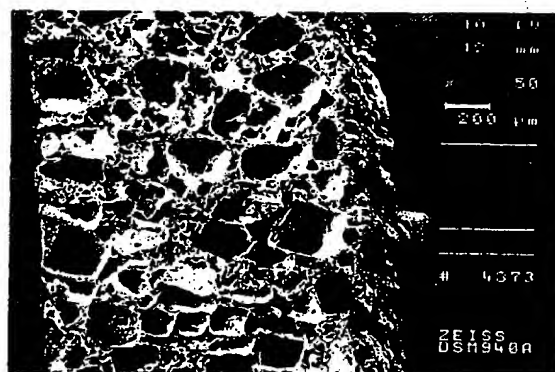
(54) Bezeichnung: PORÖSE KOMPOSITMATRIX, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to a porous composite matrix, consisting of a hyaluronic acid derivative and hydrolysed collagen. The biocompatible and biodegradable composite matrix can be used for tissue engineering of chondral and osseous tissue and for repairing musculoskeletal defects.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine poröse Kompositmatrix aus einem Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertem Kollagen, die als biokompatible und biodegradable Kompositmatrix Verwendung zum Tissue Engineering von chondralem und ossärem Gewebe und zur Reparatur muskuloskeletaler Defekte findet.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

---

### Poröse Kompositmatrix, deren Herstellung und Verwendung

---

Die Erfindung betrifft eine poröse Kompositmatrix aus einem Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertem Kollagen, die als biokompatible und biodegradable Kompositmatrix Verwendung zur Reparatur muskuloskeletaler Defekte findet.

Zur Regeneration von Gewebedefekten ist die Verwendung einer körperverträglichen, langsam biodegradablen Matrix erforderlich, die unter geeigneten Bedingungen die Differenzierung eingebrachter Zellen mit ausgeprägter Produktion einer spezifischen interzellulären Matrix ermöglicht. Im Stand der Technik sind verschiedene Matrices dieser Art bekannt.

Die WO 97/28192 offenbart ein Verfahren zur Herstellung prionenfreier Kollagenprodukte, die als schwammartiges Implantat verwendet werden können. Für okulare Anwendungen kann das Kollagenprodukt zur Erhöhung der Transparenz mit 5 Gew.-% Hyaluronsäure versetzt werden. Die Hyaluronsäure stimuliert außerdem die Zellinfiltration in das Implantat.

Die WO 91/18558 und WO 91/16867 sowie das US 4,880,429 offenbaren Kompositmatrizes aus Kollagen und bis zu 25 Gew.-% Glykosaminoglykanen wie beispielsweise Hyaluronsäure.

Die EP-A-0 784 985 offenbart einen porösen Kompositkörper, der ein bioabsorbierbares hydrophiles Material ausgewählt aus Gelatine, Hyaluronsäure und einem Hyaluronsäurederivat umfaßt. Der Körper wird zur Vermeidung einer verfrühten Resorption zusätzlich mit einer verzögert resorbierbaren Polymerschicht versehen.

Die WO 97/14376 offenbart eine Knochentransplantatmatrix aus Kollagen, die als Bindemittel Hyaluronsäure enthalten kann.

Das US 5,676,964 offenbart inter- und intramolekular vernetzte Ester von sauren Polysacchariden wie bevorzugt Hyaluronsäure. Diese Ester können als biodegradable, beispielsweise schwammige Materialien als chirurgische Gegenstände eingesetzt werden.

Die bekannten Matrizes zeigen jedoch deutliche Einschränkungen in der Bereitstellung von für die Differenzierung eingebrachter Zellen geeigneter Milieubedingungen (z.B. frühzeitige Resorption, nicht geeignete Matrixzusammensetzung) und sind auch im Hinblick auf die für die Handhabung notwendige Stabilität unbefriedigend.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin eine Matrix zur Verfügung zu stellen, die die Zelldifferenzierung und interzelluläre Matrixproduktion

unterstützt und dann selbst langsam degradiert wird. Außerdem soll die Matrix eine ausreichende Stabilität aufweisen, die die Matrix nicht nur für eine Vorkultivierung von Zellen in vitro sondern auch für eine in vivo Implantation gut geeignet und leicht handhabbar macht.

Es wurde nun gefunden, daß diese Aufgabe durch eine Kompositmatrix aus einem Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertem Kollagen bestimmter Zusammensetzung gelöst wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit eine poröse Kompositmatrix, wobei die Matrix aus Matrixbildnern umfassend ein Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertes Kollagen aufgeaut ist, und die Matrixbildner in einem Gewichtsverhältnisbereich von Hyaluronsäurederivat zu hydrolysiertem Kollagen von 30:70 bis 99:1 vorliegen.

Die erfindungsgemäße Kompositmatrix umfaßt als Matrixbildner ein Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertes Kollagen bevorzugt in einem Gewichtsverhältnis von 60:40 bis 99:1 und besonders bevorzugt von etwa 70:30.

Bevorzugt ist die Matrix nur aus dem Hyaluronsäurederivat und dem hydrolysierten Kollagen aufgebaut.

Es hat sich gezeigt, daß Matrizes mit einem Hyaluronsäurederivatanteil von unter 30 Gew.-% technisch aufgrund einer zu geringen Stabilität nachteilig sind. Umgekehrt konnte durch die erfindungsgemäße Kompositmatrix aus einem Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertem Kollagen die Zelladhäsion, die Matrixbeladung mit Zellen und die darauffolgende Zelldifferenzierung gegenüber Matrizes aus 100% Hyaluronsäurederivat, wie sie beispielsweise aus dem eingangs genannten US 5,676,964 bekannt sind, deutlich verbessert werden.

Außerdem wird durch das Hyaluronsäurederivat eine verzögert abbaubare Komponente direkt in die Kompositmatrix aufgenommen. Hierdurch kann beispielsweise die aus der EP-A-0 784 985 bekannte zusätzliche Beschichtung vermieden werden oder eine sonst gegebenenfalls notwendige Kollagenderivatisierung, die aufgrund der zum Teil nachgewiesenen Toxizität der Derivatisierungsagentien unerwünscht ist.

Als hydrolysiertes Kollagen eignet sich partiell und/oder vollständig hydrolysiertes Kollagen, insbesondere Gelatine, d.h. Kollagen in stark hydrolysierte Form. Beispielsweise kann Gelatine vom Schwein oder vom Rind eingesetzt werden. Es können jedoch auch Gelatineformen mit einer höheren Aggregationsrate in Richtung Fibrillen eingesetzt werden. Stärker aggregiertes Kollagen kann zu einer Verbesserung der Matrixstabilität führen. Solche Kollagene mit unterschiedlich großen Degradationsformen können durch eine kontrollierte, langsame Hydrolyse von fibrillärem Kollagen erzeugt werden.

Das hydrolysierte Kollagen kann gewünschtenfalls zusätzlich derivatisiert und/oder quervernetzt sein.

Als Hyaluronsäurederivat zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kompositmatrix werden Hyaluronsäureester wie Ethyl- und insbesondere Benzylester aufgrund seiner besseren biomechanischen Eigenschaften bevorzugt, wobei die Hyaluronsäure unterschiedliche Veresterungsgrade aufweisen kann. Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare Hyaluronsäureester sind in dem US-Patent Nr. 5,676,964 genannt. Die Offenbarung dieses US-Patents wird somit in die vorliegende Beschreibung aufgenommen.

Vorteilhaft ist das eingesetzte Hyaluronsäurederivat überwiegend hydrophob.

Ein bevorzugter Hyaluronsäureester ist ein Benzylester der Hyaluronsäure (HYAFF), der beispielsweise von der Firma



"Fidia Advanced Biopolymers" aus Abano Terme in Italien bezogen werden kann. HYAFF wird in verschiedenen Veresterungsgraden angeboten, von denen erfindungsgemäß ein hochveresterter Hyaluronsäurebenzylester "HYAFF 11" (100% Benzylester), der als bereits zugelassenes Wundverbandmaterial "JALOSKIN" im Handel erhältlich ist, bevorzugt wird.

Andere Hyaluronsäureester mit niedrigeren Veresterungsgraden (beispielsweise HYAFF 11 p 75, ein Hyaluronsäurebenzylester mit einem Veresterungsgrad von ca. 75%) und/oder anderen Alkoholresten, wie beispielsweise Hyaluronsäureethylester (wie etwa HYAFF 7), oder mit Mischungen verschiedener Alkoholreste sind jedoch auch einsetzbar.

Die erfindungsgemäße Kompositmatrix ist porös, insbesondere offenporig. Bevorzugt haben die Poren in der Kompositmatrix einen durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 10-1000  $\mu\text{m}$ , insbesondere 50-500  $\mu\text{m}$ . Es hat sich gezeigt, daß zu große Poren ( $> 1000 \mu\text{m}$ ) bei der Besiedelung mit Zellen zu einem hohen Zellverlust aus der Matrix, besonders bei kleinen Schwammdurchmessern führen. Bei zu kleinen Poren ( $< 100 \mu\text{m}$ ) zeigt sich ein starker Siebeffekt und die Zellen können nicht in tieferen Matrixbereichen angesiedelt werden. Jedoch kann durch einen bestimmten Anteil kleinerer Poren eine niedrigere Dichte und eine lockerere Struktur der Kompositmatrix erreicht werden. Hierdurch kann eine Beschleunigung des Abbaus in vivo ohne Änderung der für die Zellen zugänglichen Porengröße erreicht werden.

Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 100-350  $\mu\text{m}$  und Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 350-1000  $\mu\text{m}$  haben sich als vorteilhaft erwiesen. Wenn eine niedrigere Dichte oder eine lockerere Struktur der Kompositmatrix erwünscht ist, können zusätzlich Poren im Bereich von 10-100  $\mu\text{m}$ , insbesondere im Bereich von etwa 50  $\mu\text{m}$  vorhanden sein. Auch können Poren in etwa gleicher

Größe oder Poren mit einem Größegradienten bereitgestellt werden.

Zusätzlich kann die erfindungsgemäße Kompositmatrix chemisch oder physikalisch quervernetzt sein. Hierdurch läßt sich die biologische Abbaubarkeit der Kompositmatrix je nach Bedarf verzögern. Außerdem kann ein vorzeitiges Auslaugen von eventuellen Zusätzen verhindert werden. Als Vernetzungsmittel eignet sich beispielsweise Cyanamid, das Proteine und Polysaccharide vernetzt und beim biologischen Abbau keine körperfremden, schädlichen Reststoffe ergibt, da es zu Harnstoff degradiert wird.

Die erfindungsgemäße Kompositmatrix kann darüber hinaus biologisch aktive Verbindungen umfassen. Hierbei kann es sich beispielsweise um Verbindungen handeln, die die Eigenschaft der Matrix für die Besiedlung von Zellen optimieren, wie beispielsweise Antibiotika, Verbindungen zur Verbesserung der Zelladhäsion, Calciumsalze, induktive Faktoren oder weitere Glykosaminoglykane und deren Derivate. Vorteilhaft läßt sich die Zelladhäsion durch Zugabe von hochpolymerem Poly-L-lysin oder Beschichtung mit einem aktivierten Succinylderivat von Poly-L-lysin oder das Beimengen von Fibronektin oder Peptiden mit RGD-Sequenzen verbessern.

Um den Einsatz der erfindungsgemäßen Kompositmatrix in der Therapie von ossären Gewebedefekten zu optimieren, kann die Matrix Calciumsalze wie z.B. Calciumsulfate, Calciumphosphate und Calciumcarbonate beispielsweise als Suspension oder Lösung enthalten.

Zur Verminderung der Infektionsgefahr bei der Implantation der erfindungsgemäßen Kompositmatrix kann diese auch Antibiotika enthalten.

Als weitere biologisch aktive Verbindungen kann die erfindungsgemäße Kompositmatrix beispielsweise zur Optimierung der Reparatur von muskuloskeletalen Defekten

induktive Faktoren, insbesondere Cytokine wie z.B. bFGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor) oder TGFbeta (transforming growth factor) enthalten.

Die Kompositmatrix eignet sich besonders für die in vitro und in vivo Generierung von differenziertem Gewebe aus chondrozytären Zellen, mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen, Osteoblasten und Bindegewebezellen. Die Erfindung betrifft somit auch Kompositmatrizes, die diese Zellen umfassen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der vorstehend beschriebenen porösen Kompositmatrix. Dieses Verfahren umfaßt das Lösen oder Suspendieren des Hyaluronsäurederivats und des hydrolysierten Kollagens in einem geeigneten ersten Lösungsmittel, die Zugabe einer pulverförmigen Verbindung, die sich in dem ersten Lösungsmittel praktisch nicht löst, die jedoch in einem zweiten Lösungsmittel löslich ist, in dem die Matrixbildner Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertes Kollagen praktisch unlöslich sind, zu der Lösung oder Suspension, wobei die pulverförmige Verbindung eine mittlere Korngrößenverteilung im Bereich der gewünschten Porengröße der herzustellenden Kompositmatrix aufweist, das Entfernen des ersten Lösungsmittels und anschließend das Lösen der pulverförmigen Verbindung in einem zweiten Lösungsmittel, in dem sich die pulverförmige Verbindung löst und die Matrixbildner praktisch nicht lösen.

Als erstes Lösungsmittel eignet sich insbesondere 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP). Hierbei handelt es sich um eine hochflüchtige Flüssigkeit, in der sich veresterte Hyaluronsäure, hydrolysiertes Kollagen (Gelatine) sowie weitere, für die spezifischen Erfordernisse notwendige Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren und Calciumverbindungen gleichzeitig bei Raumtemperatur lösen bzw. suspendieren. Je größer die Molekülaggregate des hydrolysierten Kollagens

sind, desto schlechter ist deren Löslichkeit in HFIP. Fibrilläres Kollagen wird nicht mehr gelöst.

Die Konzentrationen der Ausgangsstoffe in dem ersten Lösungsmittel sind für das erfindungsgemäße Verfahren unwesentlich und können variiert werden, solange handhabbare Lösungen bzw. Suspensionen erhalten werden. Dies betrifft sowohl die Konzentrationen der einzelnen Komponenten, als auch die Gesamtkonzentration der Komponenten in dem ersten Lösungsmittel. Die Einzelkonzentrationen von dem Hyaluronsäurederivat und dem hydrolysierten Kollagen bestimmen das Gewichtsverhältnis der beiden Komponenten im Endprodukt. Da zum Schluß das erste Lösungsmittel dem Endprodukt entzogen wird, bestimmt die Gesamtkonzentration die Dichte und Festigkeit des Endproduktes.

Für die Handhabung der erfindungsgemäßen Kompositmatrix spielt deren mechanische Festigkeit in nassem Zustand eine wichtige Rolle. Die Festigkeit der Kompositmatrix ist bei hohem Hyaluronsäurederivatanteil in der Matrix am größten, da die Matrix hier am wenigsten quillt. Bei wachsendem Anteil des hydrolysierten Kollagens quillt die Kompositmatrix zunehmend stark und wird weniger stabil.

Bevorzugt wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren HYAFF mit 5 Gew.-% in HFIP gelöst. Hierzu kann Gelatine in variabler Einzelkonzentration von beispielsweise bis zu 7,5 Gew.-% beigegeben werden, so daß eine hohe Gesamtkonzentration von 12,5 Gew.-% Matrixbildner in der Lösung erreicht wird. Dadurch wird die Minderung der Festigkeit wegen der starken Quellung kompensiert. Lösungen mit einer Gesamtkonzentration von mehr als 12,5 Gew.-% sind sehr zäh und lassen sich schlecht handhaben. Eine Erhöhung des Anteils der Gelatine im Endprodukt ist daher nur dann durchführbar, wenn der HYAFF-Anteil reduziert wird. Jedoch mindert eine Reduktion des HYAFF-Anteils (beispielsweise auf eine Einzelkonzentration von 2,77 Gew.-% bei einer Gesamtkonzentration von 9,23 Gew.-% der Matrixbildner in der Lösung, was einem Gewichtsverhältnis



von HYAFF zu Gelatine von 30:70 entspricht) die Stabilität der Matrix ohne eine Verbesserung der Bioverträglichkeit zu ergeben.

Grundsätzlich wirkt sich der Zusatz von Gelatine positiv auf die Bioverträglichkeit und auf die histogene Eigenschaft der Matrix aus. In vitro und in vivo bewährte sich ein Gewichtsverhältnis von Hyaluronsäurederivat zu hydrolysiertem Kollagen von etwa 70:30, wobei jedoch je nach Anwendung zum Beispiel für die Bildung von Knorpel oder für die Regeneration von Knochengewebe optimale Gewichtsverhältnisse im Bereich von 99:1 bis 60:40 liegen können.

Die Porenbildung erfolgt durch Zugabe einer pulverförmigen Verbindung, die in dem ersten Lösungsmittel praktisch nicht löslich ist. Wird als erstes Lösungsmittel HFIP verwendet, so eignete sich beispielsweise Natriumchlorid als pulverförmige Verbindung zur Porenbildung. Natriumchlorid ist praktisch unlöslich in HFIP, außerdem ist es untoxisch und billig.

Neben Natriumchlorid eignet sich darüber hinaus z.B. beim Einsatz von HFIP als erstes Lösungsmittel jedes wasserlösliche und in HFIP nicht lösliche Alkali- oder Erdalkalisalz, insbesondere -halogenid. Aus den oben genannten Gründen wird jedoch Natriumchlorid bevorzugt.

Die zugegebene Menge der pulverförmigen Verbindung bestimmt die Porenzahl und damit die Dichte und auch Festigkeit der hergestellten Matrix. Als vorteilhaft hat sich ein Gewichtsverhältnis von Lösung oder Suspension zu Natriumchloridkristallen von etwa 1:2 erwiesen.

Die Porengröße wird durch die Auswahl der Korngröße der pulverförmigen Verbindung bestimmt. Käufliches Natriumchlorid hat überwiegend Körner mit einem Durchmesser zwischen 500 und 1000  $\mu\text{m}$ . Fraktionen von kleineren Größen können einfach durch zermörsern von größeren Körnern und durch Sieben durch kalibrierte Siebe hergestellt werden.

Das Gemisch aus HYAFF, Gelatine und Natriumchloridkristallen hat die Konsistenz einer dicken Paste. Durch das Pressen mit einem Stempel in Formen, beispielsweise aus innertem Kunststoff (PTFE, PE, PVC) ist es möglich, Matrixobjekte herzustellen, deren Form weitgehend dem Bedarf angepaßt werden kann. Da HFIP als Lösungsmittel sehr volatil ist, erfolgt ein schnelles Trocknen des Gemisches. Deswegen sollte das Gemisch in geschlossenen Gefäßen aufbewahrt und möglichst schnell verarbeitet werden. Das Trocknen kann beispielsweise über Nacht unter einem Abzug und anschließend einige Stunden im Vakuum erfolgen. Danach kann die Kompositmatrix aus der Form entnommen werden.

Da das Gemisch während der Trocknung kaum schrumpft, kann das Loslösen der Matrix Schwierigkeiten bereiten. Deswegen sollten die Formen so gestaltet sein, daß man den getrockneten Inhalt mit einem Stempel herausdrücken kann. Beispielsweise können zylinderförmige Matrizes mit einem Durchmesser von 3-18 mm und einer Höhe von 2-15 mm leicht hergestellt werden. Für die Herstellung von größeren Matrixblöcken haben sich kuboide, wannenförmige Formen als besonders geeignet erwiesen, die aus zerlegbaren Wand- und Bodenteilen zusammengelegt sind.

Die Poren der erfindungsgemäßen Kompositmatrix werden anschließend durch Lösen der pulverförmigen Verbindung in einem zweiten Lösungsmittel erhalten, in dem sich die pulverförmige Verbindung löst und die Matrixbildner praktisch nicht lösen. Wenn Natriumchloridkristalle als pulverförmige Verbindung verwendet werden, eignet sich als zweites Lösungsmittel insbesondere Wasser. Mehrfaches Spülen in Reinwasser entfernt das Salz und eventuell noch anhaftende Spuren von HFIP. Bei kleinen Proben empfehlen sich vier Wechsel des zweiten Lösungsmittels nach jeweils 15 Minuten Eintauchzeit, bei größeren Proben 6 Wechsel nach jeweils 20 Minuten.

Beim ersten Trocknen der Kompositmatrix durch Verdampfen des ersten Lösungsmittels werden primär geschlossene Poren mit darin enthaltenen Salzkörnern erzeugt. Während des Waschvorgangs quillt die semipermeable Substanz der Matrix auf und es kommt in den Poren zur Bildung einer osmotisch hochaktiven Salzlösung. Infolgedessen platzen bei weiterer Wasseraufnahme die Poren und die Matrix wird zum Schluß offenporig.

Falls gewünscht, kann die Kompositmatrix während oder nach der Herstellung zusätzlich mit wie oben beispielhaft genannten biologisch aktiven Verbindungen beladen werden. Vorteilhaft werden die biologisch aktiven Verbindungen zu der Lösung oder Suspension der Matrixkomponenten noch vor der Zugabe der pulverförmigen Verbindung zugesetzt.

Vorteilhaft wird die so hergestellte Kompositmatrix anschließend getrocknet. Dies kann beispielsweise durch Eintauchen in Aceton aufsteigender Konzentration (50%, 80%, 100%), blotten auf Filterpapier und anschließendes Trocknen im Vakuum erreicht werden.

Schließlich ist es ratsam, eine dünne Oberflächenschicht der Kompositmatrix beispielsweise mit einer scharfen Klinge zu entfernen, da in dieser Schicht eine hohe Zahl von geschlossenen Poren verbleibt, was das Eindringen von Zellen in die Tiefe behindert.

Vor einem Beladen mit Zellen wird die Kompositmatrix vorteilhaft sterilisiert. Dies kann durch verschiedene bekannte Sterilisationsverfahren wie beispielsweise mit Alkohol, Ethylenoxid oder durch gamma-Sterilisation erfolgen. Bevorzugt wird eine gamma-Sterilisation mit beispielsweise 350.000 rad.

Die erfindungsgemäße Kompositmatrix eignet sich für die in vitro und in vivo Generierung von differenziertem Gewebe aus chondrozytären Zellen, mesenchymalen Stamm- und

Progenitorzellen, Osteoblasten und Bindegewebezellen. Durch eine spezifisch angepaßte Matrixzusammensetzung sowie Matrixgeometrie wird hiermit die Reparatur muskuloskeletaler Defekte möglich.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch die Verwendung der oben beschriebenen Kompositmatrix zur Generierung von differenziertem Gewebe aus chondrozytären Zellen oder mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen, wobei frisch entnommene oder amplifizierte Zellen zu der Kompositmatrix zugegeben und gegebenenfalls unter chondro-, osteo- oder fibrogenen Bedingungen kultiviert werden.

Durch Zugabe von frisch entnommenen Chondrozyten oder mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen oder von in vitro amplifizierten, dedifferenzierten Chondrozyten oder mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen zu der erfindungsgemäßen Kompositmatrix unter chondrogenen Kulturbedingungen kann somit ein biomechanisch belastbares Gelenkknorpelgewebe hergestellt werden. Die erfindungsgemäße Kompositmatrix eignet sich somit zum Tissue Engineering von Gewebetypen des Binde- und Stützapparates, insbesondere von chondralem und ossärem Gewebe.

Eine so hergestellte, biokompatible und biodegradable Kompositmatrix eignet sich ohne oder mit vorheriger in vitro Kultivierung zur in vivo Differenzierung zu Gewebetypen des Binde- und Stützapparates, insbesondere zu chondralem und ossärem Gewebe unter ektopter oder autotoper Implantation.

Die erfindungsgemäße Kompositmatrix eignet sich beispielsweise für humane Chondrozyten, die aus hyalinem Knorpel gewonnen wurden. Dabei können hyaline Gelenkknorpel von Autopsien sowie Restknorpelbestände aus der Durchführung von Totalendoprothesen den Entnahmesprung darstellen. Außerdem eignen sich embryonale Chondrozyten, wie sie beispielsweise von Abtreibungen erhalten werden können. Darüber hinaus können adulte mesenchymale Stamm- und



Progenitorzellen beispielsweise aus Knochenmark, Synovium oder Periost sowie bevorzugt embryonale mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen beispielsweise aus der Nabelschnur verwendet werden. Embryonale mesenchymale Stammzellen bieten den Vorteil einer fehlenden Abstoßung bei allogener Transplantation. Zudem stehen sie ständig in ausreichender Zahl zur Verfügung und können ohne einen zusätzlichen Eingriff am Patienten gewonnen werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Implantat, das eine erfindungsgemäße poröse Kompositmatrix umfaßt. Ein solches Implantat, das vorzugsweise mit der Kompositmatrix beschichtet ist, hat den Vorteil, daß eine bessere Integration zum Knochen und gegebenenfalls auch zum umgebenden Bindegewebe hergestellt wird.

Als Implantatoberflächen, die mit der erfindungsgemäßen Kompositmatrix beschichtet werden, eignen sich insbesondere Oberflächen aus Metall, wie beispielsweise Titan oder Stahl, einem Polymer oder Keramik.

Die erfindungsgemäße Kompositmatrix weist den Vorteil auf, daß es beim Beladen der Matrix mit Zellen nur zu einer geringen Größenveränderung kommt. Bekannte Kollagenmatrizes zeigen beim Beladen mit Zellen starke Größenunterschiede (zunächst massives Aufquellen, dann starke Tendenz sich einzukugeln). Für die Anwendung von Tissue-Engineering (in vitro Erzeugung von Gewebe mit dem Ziel, dieses in einen Defekt einzubauen) ist jedoch eine Größenstabilität der Matrix auch nach Zellbeladung und Kultivierung von großem Vorteil. Dies wird durch die erfindungsgemäße Kompositmatrix und insbesondere durch die gleichzeitige Mischung der Matrixbildner unter Verwendung von HFIP erreicht.

Darüber hinaus werden mit der erfindungsgemäßen Kompositmatrix folgende weitere Vorteile erzielt:

In stationärer Kultur ist eine Redifferenzierung amplifizierter Chondrozyten in der Kompositmatrix möglich. Es werden knorpeltypische Proteoglykane (Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Aggregan) sowie Kollagen II gebildet. Dies konnte nach 2-, 4- und 6-wöchiger Kultivierung nachgewiesen werden.

Das in vitro erzeugte Produkt aus auf der Kompositmatrix kultivierten Chondrozyten zeigt eine deutliche Zunahme in der biomechanischen Stabilität im Vergleich zur Ausgangsbedingung am Zeitpunkt des Aufbringens von Zellen auf der Matrix.

Ohne Zellen löst sich die Matrix in vitro nach ca. 14 Tagen auf. In vivo läßt sich eine Resorption nach ca. 6-8 Wochen beobachten (Nacktmaus, Kaninchen).

Gute Differenzierungsfähigkeit von Knochenmarkzellen zu hyalinartigem Gewebe in vitro.

Sehr gute Differenzierung zu ossärem Gewebe beim Einbau in Subkutangewebe von Nacktmäusen, Resorption der Matrix in vivo erst nach 6 Wochen.

Beim Einbau in osteochondrale Defekte im Kniegelenk von Kaninchen ist eine Integration des Zell-Matrixkonstruktes erkennbar (Zellen waren hierbei Knochenmarkzellen oder Chondrozyten), Differenzierung zu Knorpelgewebe ist erkennbar. Im ossären Defektanteil zeigt sich knöcherne Integration und Ausdifferenzierung zu neuem Knochengewebe.

Keine Entzündungsneigung durch Material im Kniegelenk nachweisbar (kein Gelenkerguß, kein massiver Anstieg von Entzündungszellen).

Einbau des Zell-Matrixkonstruktes in Meniskusdefekte des Kaninchens nach vorheriger Kultivierung in vitro möglich, gute Regeneration des Meniskusdefektes, keine Entzündungsneigung im Kniegelenk.



In der Kombination mit dem Hyaluronsäurederivat ist das sonst auftretende negative Quellen bei Gelatine oder Kollagen nach Befeuchten der trockenen Matrix nicht gegeben. Dies ist für Tissue Engineering Matrices, bei denen ein bestimmtes vorgegebenes Defektareal zu reparieren ist, besonders günstig.

Die anliegenden Figuren zeigen Vergrößerungen der erfindungsgemäßen Kompositmatrix. Es zeigen:

Figur 1 eine 50-fache Vergrößerung einer stabileren Struktur (oben) und einer schwächeren Struktur (unten),

Figur 2 eine 100-fache Vergrößerung der stabileren Struktur (oben) und der schwächeren Struktur (unten),

Figur 3 eine 200-fache Vergrößerung der stabileren Struktur (oben) und der schwächeren Struktur (unten) und

Figur 4 in den Poren wachsende Chondrozyten bei 200-facher Vergrößerung (oben) und 1000-facher Vergrößerung (unten).

Die jeweils stabilere Struktur in Figuren 1-3 wurde durch eine höhere Gesamtkonzentration der Matrixkomponenten in der Lösung während der Herstellung erhalten, wobei die Gesamtkonzentration von 6,3% für die schwächere Struktur bis 9,2% für die stabilere Struktur variiert wurde.

Die fadenartigen Strukturen in Figur 4 deuten auf die beginnende Produktion der extrazellulären Matrix hin.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern.

### Beispiel 1

Eine erfindungsgemäße Kompositmatrix wurde durch Auflösen von HYAFF und Gelatine in HFIP, Zugabe von Natriumchloridkristallen, Formen und Trocknen der entstandenen Paste, sowie durch Entfernen des Natriumchlorids durch mehrfaches Spülen mit Wasser hergestellt. Nach dem Trocknen wurde die Kompositmatrix einer gamma-Sterilisation unterzogen.

### Beispiel 2

#### Präparationsbeschreibung

#### **Gewinnung von Chondrozyten für die primäre Zellkultur**

##### *Adulter Gelenkknorpel/Embryonaler Knorpel*

Hyaliner Gelenkknorpel (adult/embryonal) wurde nach Entnahme sofort in RPMI-Medium transferiert und möglichst schnell aufgearbeitet (kleiner 24h). Hierzu wurde der Knorpel zunächst mechanisch vom Knochen getrennt und dann mit einem Skalpell zerkleinert (Endgröße: 1-2 mm große Knorpelstückchen). Bei 37°C erfolgte daraufhin unter ständigem Schwenken ein enzymatischer Andau mit Kollagenase, Hyaluronidase und DNase. Die Enzyme wurden in RPMI-Medium mit Hepes-Puffer, L-Glutamin und Zusatz von Penicillin/Streptomycin (Antibiotikazusatz) resuspendiert. Das optimierte enzymatische Dissoziationsintervall betrug 12 Stunden. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium (RPMI mit 10% AB-Serum oder RPMI mit 10% fetalem Rinderserum (FBS)) wurde die enzymatische Aktivität gepuffert. Daraufhin erfolgte die Extraktion noch verbliebener extrazellulärer Matrixstücke durch Filtern und Zentrifugieren der Suspension, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets in RPMI mit 10% AB-Serum oder RPMI mit 10% FBS. Nach einer Zellzählung folgte eine stationäre Kultivierung und Amplifikation der Chondrozyten für 14-21 Tage (2 mal pro



Woche Mediumwechsel mit serumhaltigem Medium). Nach Erreichen von Konfluenz erfolgte ein Passagieren der Zellen (Entfernen des Mediums, Zugabe von 0,25% Trypsin, nach Aufheben der Zelladhärenz Zugabe von serumhaltigem Medium, Zentrifugation der Zellsuspension und Resuspendieren des daraufhin gewonnenen Pellets in frischem Medium, Zellzählung und erneutes Aussähen der Zellen). Hierbei wurde zumeist eine 1 in 4 Teilung durchgeführt, d.h. eine Kulturflasche lieferte die Zellen für 4 neue Flaschen. Nach erneuter Konfluenz (ca. nach 2-4 Wochen) wurden die Zellen (Sekundärkultur) durch erneute Trypsinbehandlung (siehe oben) von dem Kulturboden abgelöst und für die Beladung der Matrices vorbereitet.

Es können jedoch auch Zellen in Primär- und Tertiärkultur (2 Passagierungsschritte) verwendet werden.

*Embryonale mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen aus der Nabelschnur*

Die Zellen wurden in DMEM Medium mit 10% FBS kultiviert und nach Erreichen von Konfluenz als Primärkultur für die Matrixbeladung verwendet. Die Gewinnung der adhärenenten Zellen erfolgte wiederum durch die oben beschriebene Trypsinanwendung.

*Adulte mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen aus Knochenmark*

Knochenmark wurde aus dem Darmbeinkamm von 4 Monate alten weißen Neuseelandhasen gewonnen. Zu dem Aspirat wurde "Dolbecco's modified Eagle's Medium" (DMEM) mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) zugegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden  $20 \times 10^6$  Zellen in 100 mm Zuchtschalen bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt bis die Zellen 80% konfluent waren. Adhärenente Zellen wurde wie oben beschrieben mit Trypsin behandelt, gezählt, gewaschen und in DMEM auf eine Endkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/25 µL resuspendiert.

### **Matrixbeladung**

Zur Matrixbeladung wurde das Zellpellet in wenig Medium aufgenommen ( $1 \text{ mm}^3/1 \text{ }\mu\text{l}$ ). Daraufhin erfolgte das Beladen der Matrix (steril, bisher trocken) von einer Seite. Dadurch wurde das Entweichen von Luft, die sich in der Matrix befand, sichergestellt (Einwirkzeit 1-5 Minuten). Daraufhin wurde durch Erzeugen eines Unter- und Überdruckes mit einer Pipettenspitze noch verbliebenes Medium mit hoher Zellkonzentration in die Matrix transferiert. Es sollte eine möglichst homogene Verteilung von Zellen in der Matrix erreicht werden. Durch die Zugabe von Detergenzstoffen kann die Beladung erleichtert werden.

Anschließend erfolgte eine Inkubation von 2h im Inkubator ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ). Dies erlaubte den Zellen, sich an der vorliegenden Matrix zu adhärieren.

Abschließend wurde das Zell-Matrixkonstrukt mit Medium voll überschichtet und weiterkultiviert.

### **Kulturbeschreibung**

#### **Stationäre Kultur**

Hierfür wurden unterschiedliche Kulturmedien verwendet:

RPMI mit 10% AB-Serum (Human),

RPMI mit 10% FBS oder

"Dulbecco's modified Eagle's Medium" (DMEM) mit hohem Glucosegehalt und Nähr- sowie Zusatzstoffen (ITS und Pyruvat plus Dexamethason, Ascorbinsäure und TGF  $\beta$ 1). (Vgl. B. Johnstone in Exp. Cell Res. 238 (1998)).



### Kontinuierliche Perfusionskultur

Eine alternative Kultivierungsbedingung stellt die kontinuierliche Perfusionskultur in RPMI-Medium mit 10% AB-Serum dar.

#### Beispiel 3

Um die Wirksamkeit der Beladung der erfindungsgemäßen Kompositmatrix mit Zellen zu untersuchen, wurde eine gemäß Beispiel 1 hergestellte Kompositmatrix mit den gemäß Beispiel 2 gewonnenen Knochenmarkzellen beladen. Ein Teil der Matrizes wurde sofort in Formalin fixiert, gewaschen und in Paraffin eingebettet (Gruppe I). Andere beladene Matrizes (Gruppe II) wurden für 14 Tage in einem chondrogenen Medium enthaltend DMEM mit ITS + Vormischung (Collaborative Biomechanical Products), Pyruvat (1mM), Ascorbinsäure-2-phosphat (37,5 µg/ml), Dexamethason ( $10^{-7}$ M) und TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml), kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

Die Zellsuspension wurde unter leichtem Quellen des Konstrukts in die Matrix eingebracht. Durch Toluidinblau gefärbte Bereiche der Matrizes aus Gruppe I konnte gezeigt werden, daß eine hohe Zellbeladung in allen Poren der Matrizes vorlag. Nach 14 Tagen unter chondrogenen Kulturbedingungen (Gruppe II) waren die ursprünglich weichen Zellmatrixkonstrukte gehärtet. Die Tuluidinblau gefärbten Bereiche zeigten Zellen mit einer ausgeprägten metachromatisch färbenden extrazellulären Matrix, die in der gesamten Kompositmatrix vorlag. Die extrazelluläre Matrix enthielt Kollagen II.

#### Beispiel 4

Wie in Beispiel 3 mit Zellen beladene Kompositmatrizes wurden subkutan in immundefiziente Mäuse implantiert (Gruppe III). Gleiche Matrizes wurden für 14 Tage in vitro in dem in Beispiel 3 beschriebenen chondrogenen Medium kultiviert und

dann in vivo implantiert (Gruppe IV). Die Implantate wurden nach 3 Wochen entnommen, in Formalin fixiert, entkalkt und in Paraffin eingebettet.

Es wurden 5 µm dicke Scheiben der Proben geschnitten und mit Toluidinblau gefärbt. Die gefärbten Bereiche wurden nach ihrer osteochondralen Differenzierung bewertet (0 (weder Knochen noch Knorpel in den Matrixporen) bis 4 (mehr als 75% der Poren enthalten Knochen und/oder Knorpel)).

Nach 3 Wochen in vivo trat weder bei den Gruppe III noch bei den Gruppe IV Implantaten eine wesentliche Größenveränderung auf. Die für 14 Tage in vitro vorkultivierten Implantate (Gruppe IV) erschienen jedoch qualitativ härter als die Kompositmatrizes, die sofort nach der Beladung mit den Zellen implantiert wurden (Gruppe III). Das Färben mit Toluidinblau ergab eine osteochondrale Differenzierung von Zellen in den Kompositmatrizes beider Gruppen, wobei sich die Poren mit Knorpel und Knochen füllten. Die Kompositmatrizes der Gruppe IV enthielten jedoch mehr Knochen und Knorpel (durchschnittliche Bewertung = 4, verglichen mit einer Bewertung von 3 für Gruppe III). Außerdem war der Anteil an Knochen in den Proben der Gruppe IV größer (Verhältnis von Knochen: Knorpel: fibrösem Gewebe in Gruppe III: 40:20:40 und in Gruppe IV: 85:10:5).



Patentansprüche

1. Poröse Kompositmatrix, wobei die Matrix aus Matrixbildnern umfassend ein Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertes Kollagen aufgebaut ist, und die Matrixbildner in einem Gewichtsverhältnisbereich von Hyaluronsäurederivat zu hydrolysiertem Kollagen von 30:70 bis 99:1 vorliegen.

2. Kompositmatrix nach Anspruch 1, worin die Matrixbildner in einem Gewichtsverhältnisbereich von Hyaluronsäurederivat zu hydrolysiertem Kollagen von 60:40 bis 99:1, bevorzugt in einem Gewichtsverhältnis von etwa 70:30 vorliegen.

3. Kompositmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das hydrolysierte Kollagen partiell und/oder vollständig hydrolysiert ist.

4. Kompositmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das hydrolysierte Kollagen zusätzlich derivatisiert und/oder quervernetzt ist.

5. Kompositmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Hyaluronsäurederivat ein Hyaluronsäureester ist.

6. Kompositmatrix nach Anspruch 5, worin der Hyaluronsäureester ein Ethyl- oder Benzylester der Hyaluronsäure ist.

7. Kompositmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 10-1000 µm.

8. Kompositmatrix nach Anspruch 7, worin die Poren einen durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 100-350  $\mu\text{m}$  aufweisen.

9. Kompositmatrix nach Anspruch 7, worin die Poren einen durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 350-1000  $\mu\text{m}$  aufweisen.

10. Kompositmatrix nach Anspruch 8 oder 9, worin zusätzlich Poren im Bereich von 10-100  $\mu\text{m}$  vorhanden sind.

11. Kompositmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die Quervernetzungen aufweist.

12. Kompositmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend biologisch aktive Verbindungen wie Antibiotika, Verbindungen zur Verbesserung der Zelladhäsion, Calciumsalze, induktive Faktoren oder weitere Glykosaminoglykane und deren Derivate.

13. Kompositmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend Chondrozyten, mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen, Osteoblasten oder Bindegewebezellen.

14. Verfahren zur Herstellung einer porösen Kompositmatrix gemäß einem der Ansprüche 1-13, umfassend das Lösen oder Suspendieren des Hyaluronsäurederivats und des hydrolysierten Kollagens in einem geeigneten ersten Lösungsmittel, die Zugabe einer pulverförmigen Verbindung, die sich in dem ersten Lösungsmittel praktisch nicht löst, die jedoch in einem zweiten Lösungsmittel löslich ist, in dem die Matrixbildner Hyaluronsäurederivat und hydrolysiertes Kollagen praktisch unlöslich sind, zu der Lösung oder Suspension, wobei die pulverförmige Verbindung eine mittlere Korngrößenverteilung im Bereich der gewünschten Porengröße der herzustellenden Kompositmatrix aufweist, das Entfernen des ersten Lösungsmittels und anschließend das Lösen der pulverförmigen Verbindung in einem zweiten Lösungsmittel, in



dem sich die pulverförmige Verbindung löst und die Matrixbildner praktisch nicht lösen.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin das erste Lösungsmittel 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol ist.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, worin die pulverförmige Verbindung ein wasserlösliches Alkali- oder Erdalkalisalz, insbesondere ein Alkalihalogenid wie Natriumchlorid ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14-16, worin das zweite Lösungsmittel Wasser ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14-17, worin die Kompositmatrix zusätzlich geformt, getrocknet und gegebenenfalls sterilisiert wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14-18, worin die Kompositmatrix zusätzlich gegebenenfalls mit biologisch aktiven Verbindungen und Chondrozyten, mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen, Osteoblasten oder Bindegewebezellen beladen wird.

20. Verwendung einer Kompositmatrix nach einem der Ansprüche 1-13 zur Generierung von differenziertem Gewebe aus chondrozytären Zellen oder mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen, wobei frisch entnommene oder amplifizierte Zellen zu der Kompositmatrix zugegeben und gegebenenfalls unter chondro-, osteo- oder fibrogenen Bedingungen kultiviert werden.

21. Verwendung nach Anspruch 20 zum Tissue Engineering von Gewebstypen des Binde- und Stützapparates, insbesondere von chondralem und ossärem Gewebe.

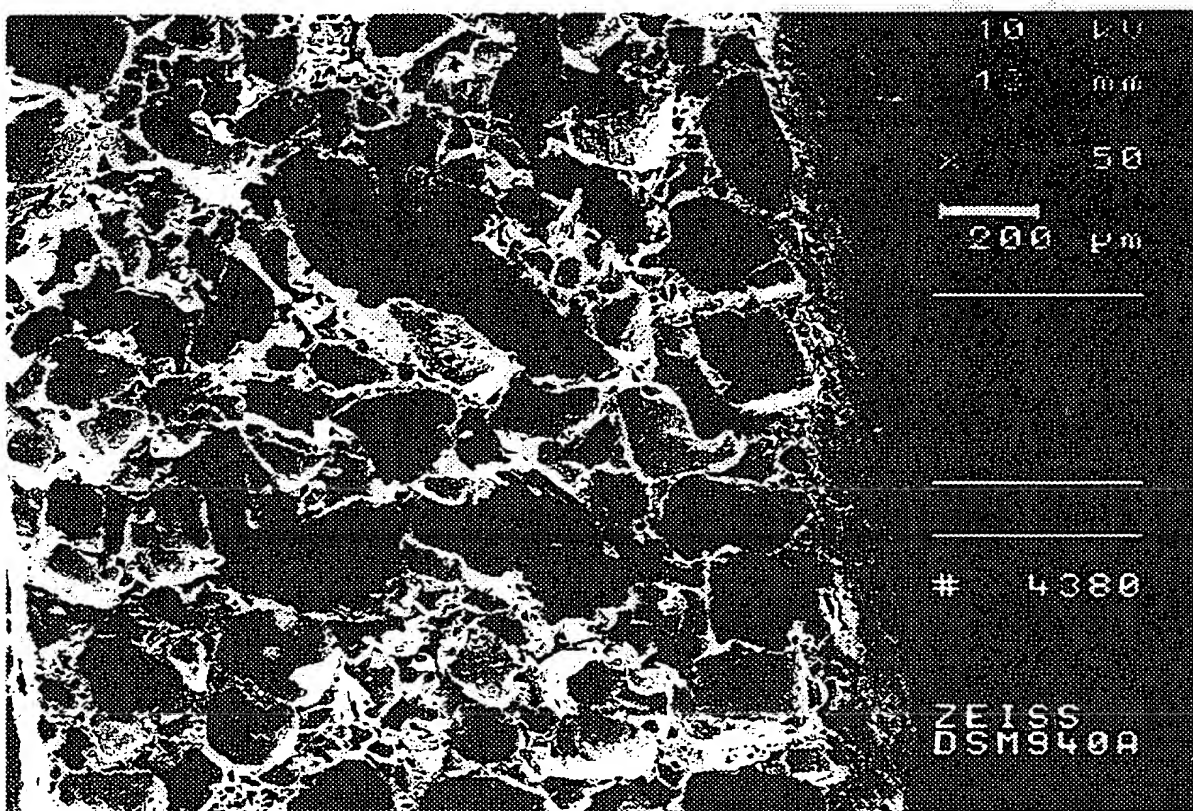
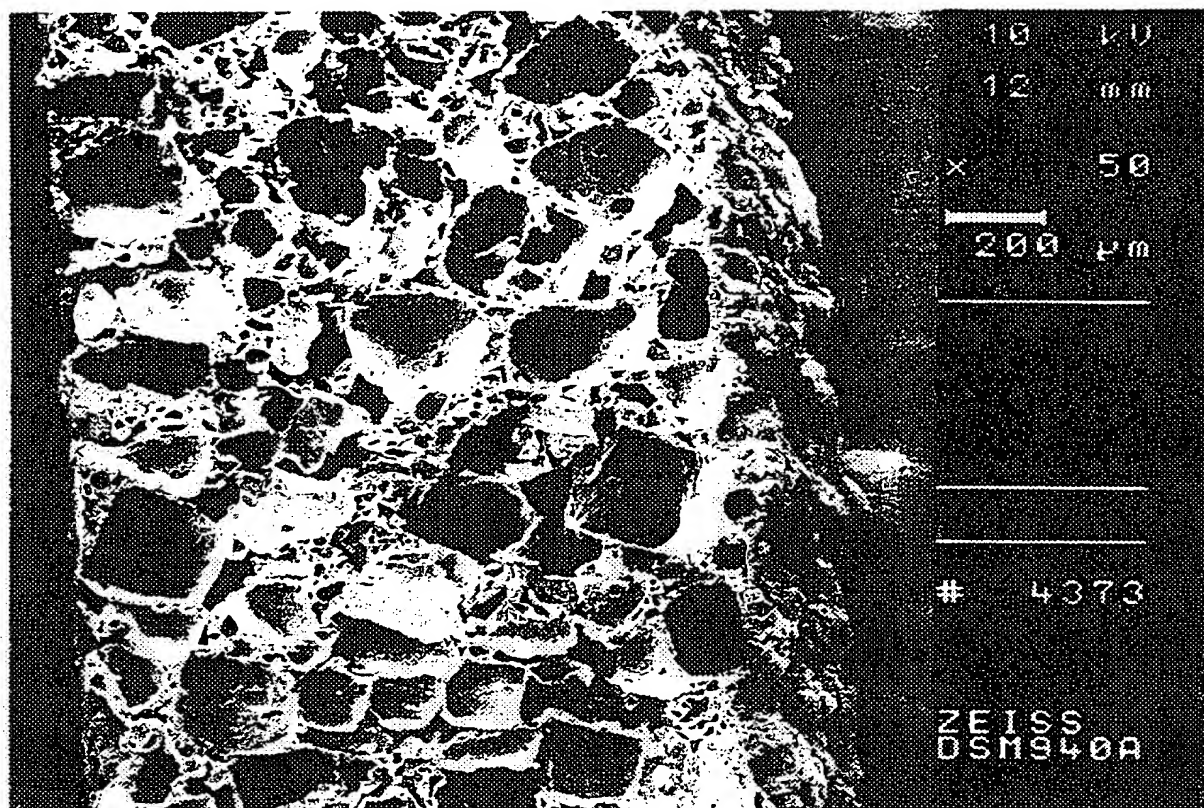
22. Verwendung nach Anspruch 20 zur in vivo Differenzierung der Zellen zu Gewebstypen des Binde- und

Stützapparates, insbesondere zu chondralem und ossärem Gewebe.

23. Implantat, umfassend eine poröse Kompositmatrix nach einem der Ansprüche 1-13.

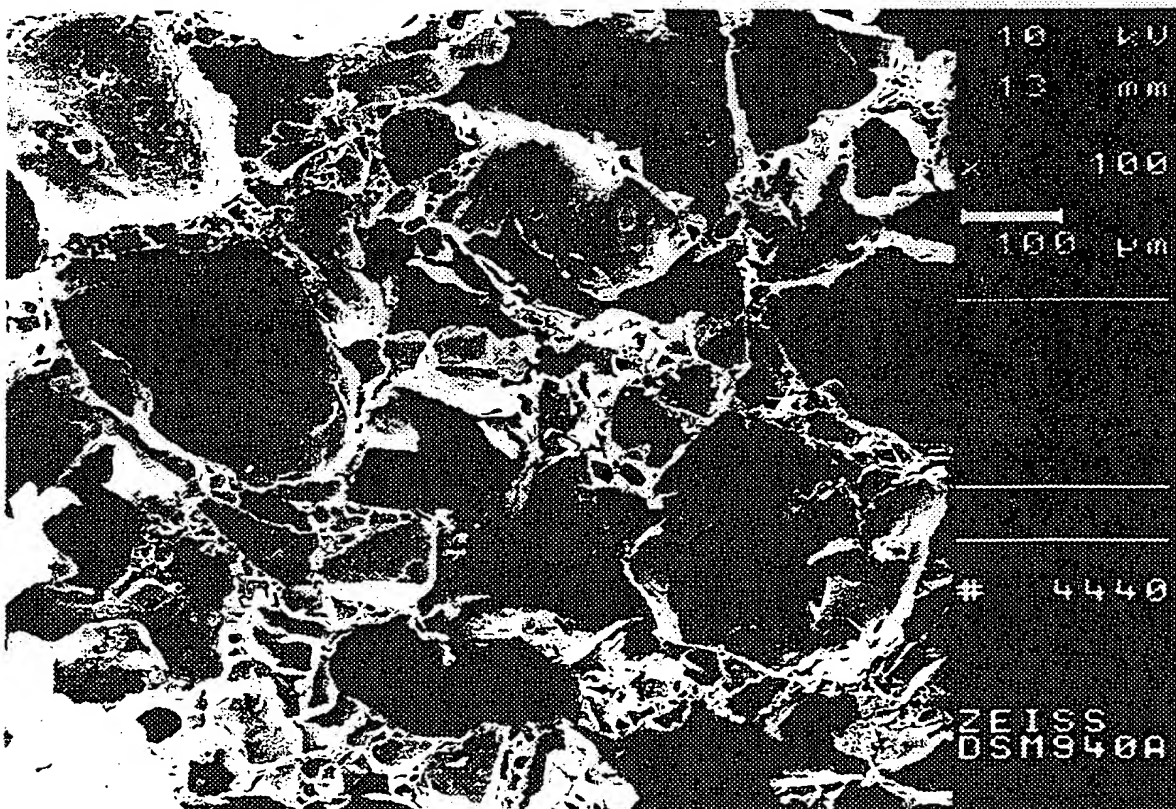
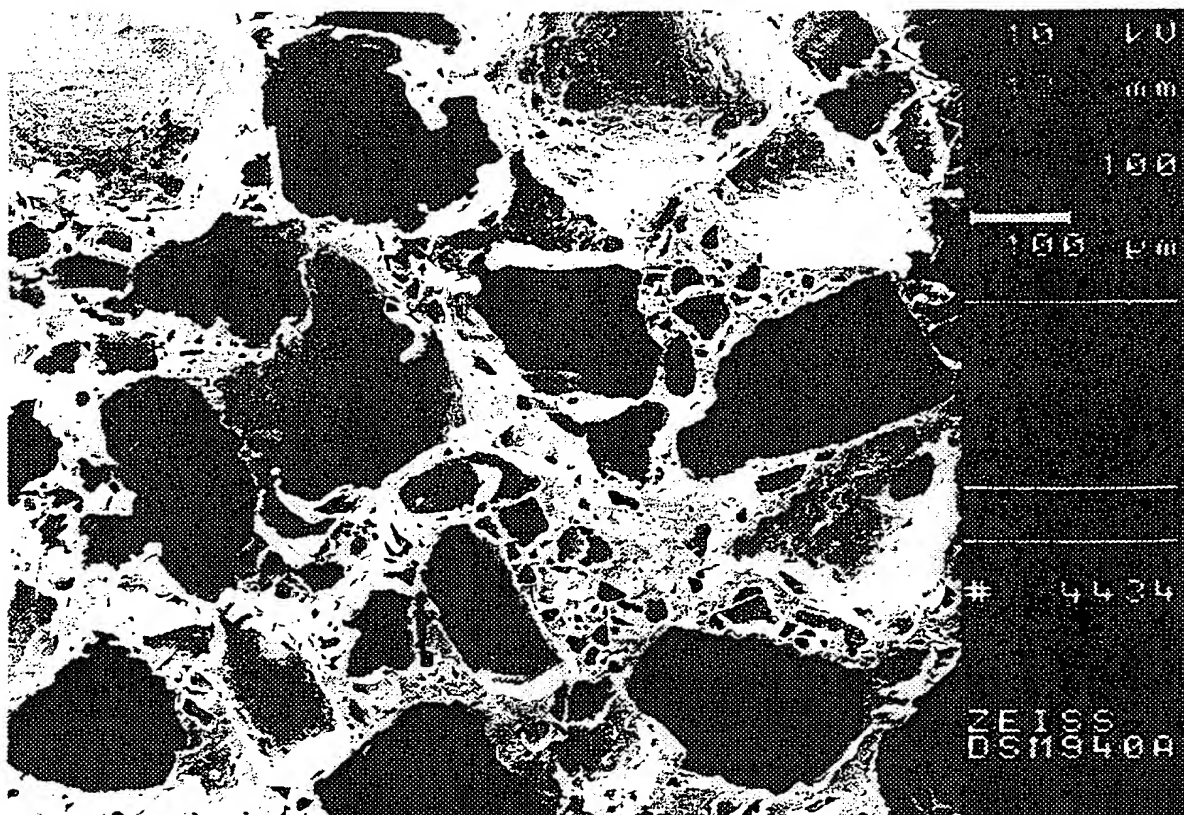
24. Verfahren zur Herstellung eines Implantats gemäß Anspruch 23, worin eine poröse Kompositmatrix nach einem der Ansprüche 1-13 auf die Implantatoberfläche aufgeschichtet wird.

Figur 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

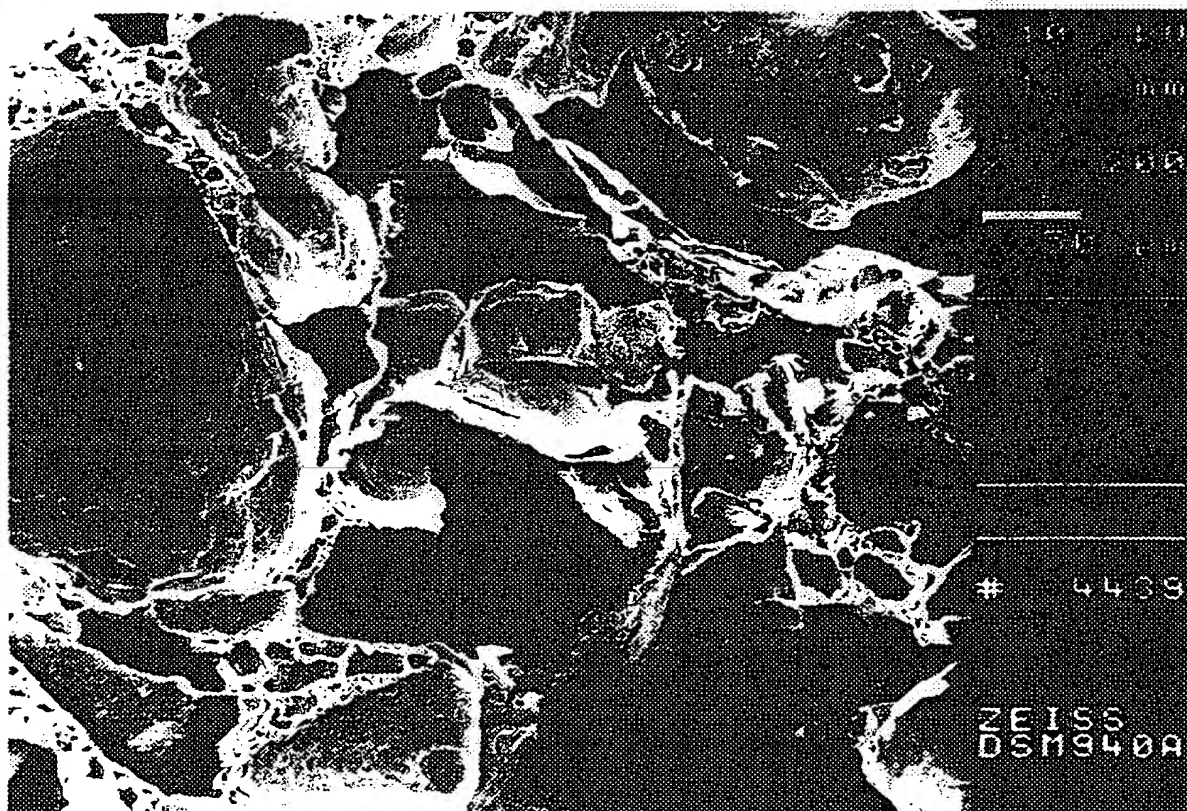
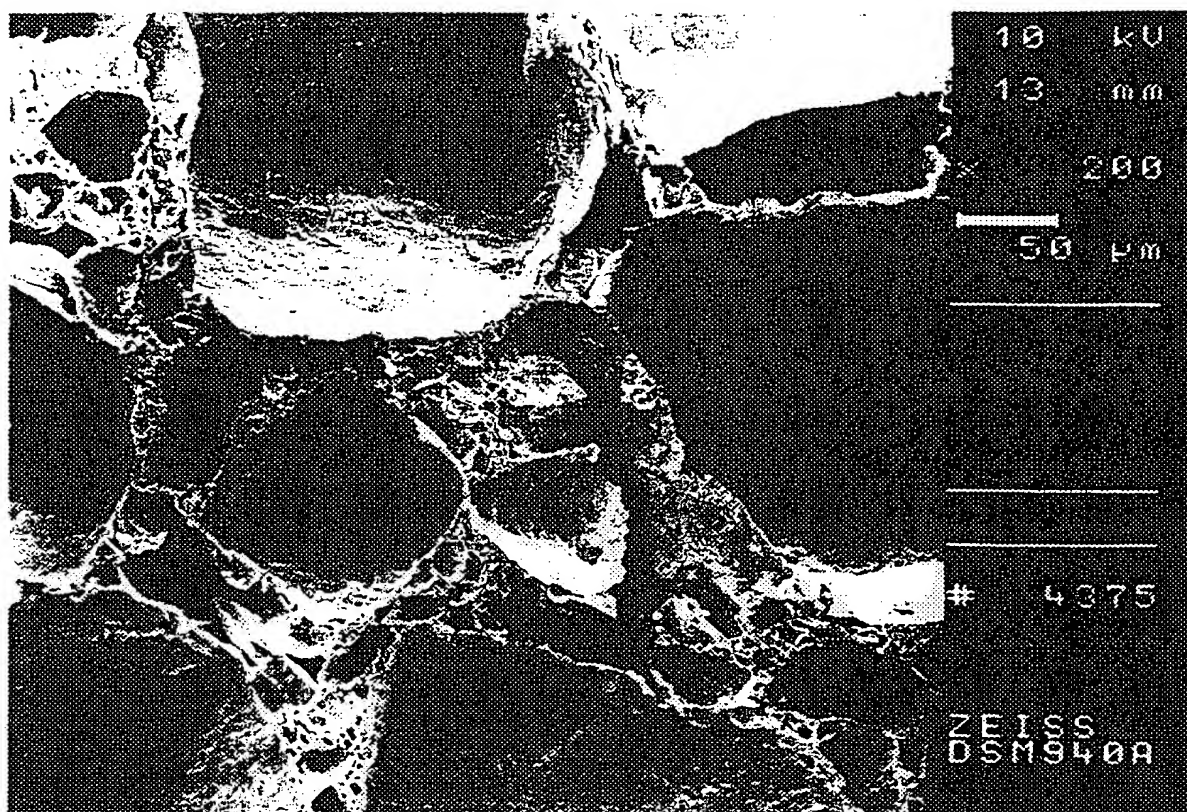
Figur 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)



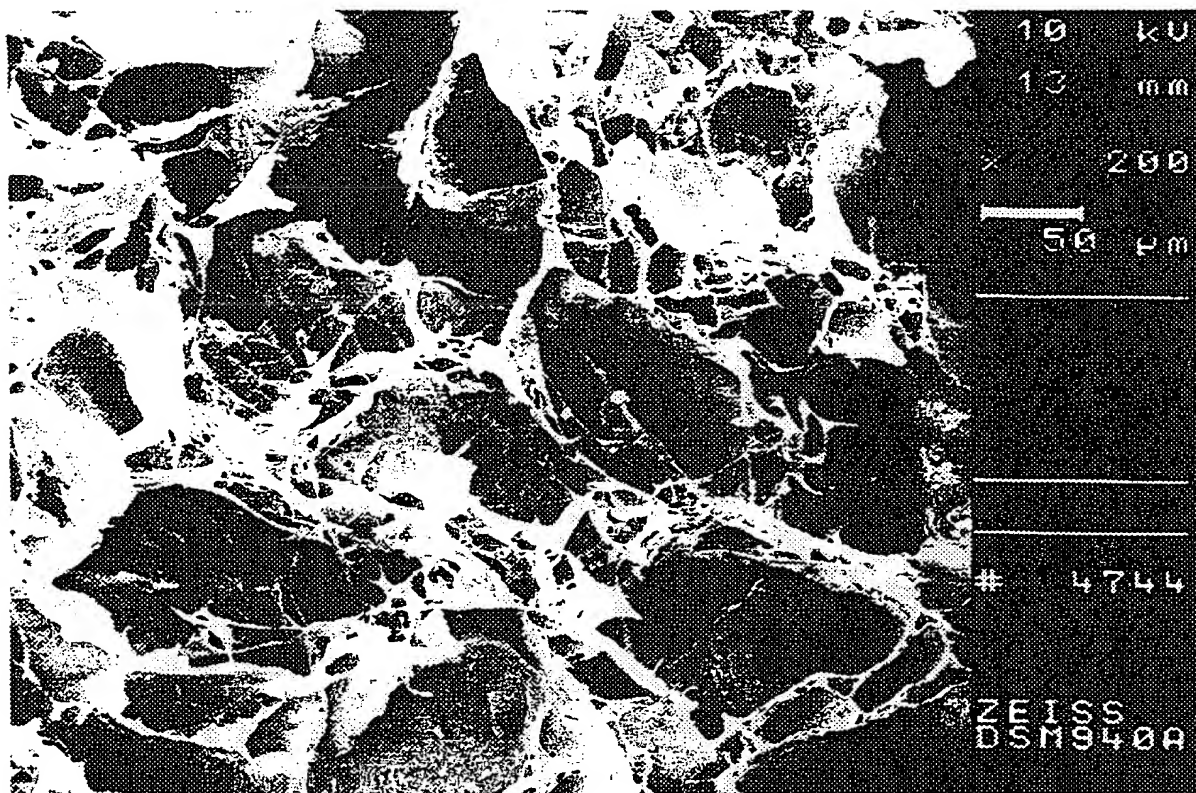
Figur 3



THIS PAGE BLANK (US)

THIS PAGE BLANK (US)

Figur 4



THIS PAGE BLANK

THIS PAGE BLANK